

Abstract of DE3506703

A method for identifying a unknown organism by comparison of the nucleotide sequence of nucleic acid in a sample with known nucleotide sequences and a determination that an unknown nucleotide sequence is present in the sample.

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Patentschrift
⑪ DE 3506703 C 1

⑤① Int. Cl. 4:
G01 N 33/68

②① Aktenzeichen: P 35 06 703.9-52
②② Anmeldetag: 26. 2. 85
④③ Offenlegungstag: —
④⑤ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 30. 4. 86

DE 3506703 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦③ Patentinhaber:
Sagax Instrument AB, Sundbyberg, SE

⑦④ Vertreter:
Nöth, H., Dipl.-Phys., Pat.-Anw., 8000 München

⑦② Erfinder:
Nygren, Håkan, Billdal, SE; Stenberg, Manne,
Göteborg, SE

⑤⑤ Im Prüfungsverfahren entgegengehaltene
Druckschriften nach § 44 PatG:

DE-OS 32 11 311
DE-OS 23 30 702
EP 70 687

⑤④ Verfahren zur Sequenzanalyse von Nucleinsäuren, insbesondere der Desoxyribonucleinsäure (DNA) und der Ribonucleinsäure (RNA), sowie Träger zur Durchführung des Verfahrens und Verfahren zur Herstellung des Trägers

Ein Verfahren zur Sequenzanalyse von Nucleinsäuren, bei dem die zu untersuchende flüssige Probe, welche denaturierte Nucleinsäure aufweist, mit einer lichtreflektierenden Trägeroberfläche in Berührung gebracht wird, die einen an dieser Oberfläche chemisch gebundenen Nucleinsäurestrang mit bestimmter Sequenz aufweist, wobei sich komplementäre Sequenzen der in der Probe befindlichen denaturierten Nucleinsäure mit dem am Träger fixierten Nucleinsäurestrang durch Hybridisierung vereinigen, und das Dickenwachstum der sich dabei auf der Trägeroberfläche bildenden organischen Schicht durch Vergleichsellipsometrie- oder Interferenzmessung oder Änderung der Interferenzerscheinungen an der doppelschichtig ausgebildeten reflektierenden Oberfläche ermittelt wird.

DE 3506703 C 1

Fig. 1

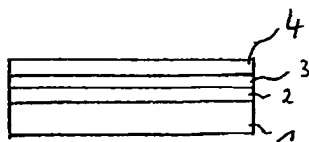


Fig. 2

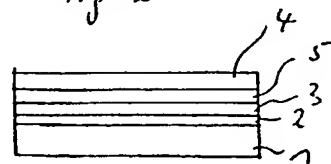
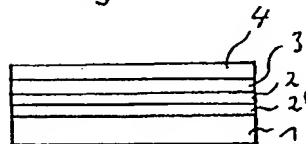


Fig. 3



Patentansprüche:

1. Verfahren zur Sequenzanalyse von Nucleinsäuren, insbesondere der Desoxyribonucleinsäure (DNA) oder Ribonucleinsäure (RNA), bei dem die zu untersuchende Nucleinsäure während der Analyse auf einem festen Träger immobilisiert wird, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchende flüssige Probe, welche denaturierte Nucleinsäure aufweist, mit einer lichtreflektierenden Oberfläche des Trägers, an den ein Nucleinsäurestrang mit bestimmter Sequenz chemisch gebunden ist, in Berührung gebracht wird, wobei sich komplementäre Sequenzen der in der Probe vorhandenen denaturierten Nucleinsäure mit dem an der Trägeroberfläche vorhandenen Nucleinsäurestrang durch Hybridisierung vereinigen, und daß das Dickenwachstum der sich dabei auf der Trägeroberfläche bildenden organischen Schicht optisch bestimmt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Dickenwachstum aus den Änderungen der Reflexionseigenschaften der reflektierenden Trägeroberfläche bestimmt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Dickenwachstum durch ellipsometrische Messung bestimmt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Dickenwachstum durch Interferenzmessung bestimmt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Dickenwachstum durch Vergleichsellipsometriemessung bestimmt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Dickenwachstum aus Interferenzänderungen bei der Reflexion von Licht an einer reflektierenden Oberfläche, die eine aus Siliciumdioxid und Siliciumdioxid bestehende Doppelschicht aufweist, bestimmt wird.
7. Träger zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägeroberfläche lichtreflektierend ausgebildet ist und der eine bestimmte Sequenz aufweisende Nucleinsäurestrang durch chemische Bindung an der Trägeroberfläche haftet.
8. Träger nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Nucleinsäurestrang durch kovalente Bindung an der Trägeroberfläche haftet.
9. Träger nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Trägerkörper aus Silicium oder Glas besteht.
10. Träger nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Trägerkörper an seiner lichtreflektierenden Oberfläche eine Siliciumdioxid- oder Aluminiumoxidschicht aufweist, auf der eine Schicht aus funktionellem Siliciumwasserstoff sich befindet, an welchem der Nucleinsäurestrang kovalent gebunden ist.
11. Träger nach einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Nucleinsäurestrang über eine Polysaccharidzwischenschicht an der reflektierenden Trägeroberfläche kovalent gebunden ist.
12. Träger nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Siliciumwasserstoff als funktionelle Gruppen Amino- oder Epoxygruppen aufweist.
13. Verfahren zur Herstellung eines Trägers nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß ein eine

funktionelle Gruppe aufweisender Siliciumwasserstoff auf die reflektierende Oberfläche des Trägers aufdestilliert wird und anschließend darauf der Nucleinsäurestrang aus einer Pufferlösung, in welcher die reine Nucleinsäure gelöst ist, gezüchtet wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß vor dem Aufbringen des Nucleinsäurestrangs auf die aktivierte Siliciumwasserstoffschicht durch Züchtung aus einer wäßrigen Lösung eine Polysaccharidschicht aufgebracht wird.

Desoxyribonucleinsäure (DNA) ist ein doppelsträngiges Molekül mit zwei komplementären Ketten aus den vier Nucleotidbasen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin. Die beiden Stränge der DNA sind über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verknüpft, wobei sich bestimmte Basenpaare, nämlich Adenin-Thymin und Cytosin-Guanin zusammenfinden. Die der DNA verwandte RNA enthält Ribose statt Desoxyribose und Uracil statt Thyminresten. Die spezielle DNA-Verknüpfung zu zwei komplementären Ketten führt zu dem genetischen DNA-Code, welcher die genetische Information in allen lebenden Zellen, insbesondere der Chromosomen, darstellt. Bekannte Sequenzen von DNA oder RNA können in der Biotechnologie zur Darstellung der Sequenzen von unbekanntem genetischem Material oder zu Diagnosezwecken zur Identifizierung genetischen Materials aus Viren und Bakterien verwendet werden. Herkömmliche Verfahren zur Bestimmung von DNA- oder RNA-Hybridisierung beruhen auf der Bindung von radioaktiv oder enzymatisch markierten DNA- oder RNA-Sequenzen an komplementärem, einsträngigem DNA oder RNA und nachfolgender Erfassung der Markierung. Als feste Phasen werden in den meisten Fällen Cellulose oder andere Polysaccharide zur Immobilisierung von DNA verwendet und wirken als Rezeptoren für die markierte DNA-Sonde.

Hierzu ist es beispielsweise bekannt (E. M. Southern, J. Mol. Biol. 98, 503, 1975), Fragmente der DNA durch Elektrophorese in Agarosegel zu trennen und die getrennten Fragmente zu einzelnen Strängen zu denaturieren, welche durch Diffusion auf Nitrocellulosefolie übertragen werden. Die getrennten Sequenzen werden dann identifiziert durch Inkubation radioaktiv markierter komplementärer Sequenzen, welche an ihre Targets gebunden werden. Das radioaktive Isotop wird dann lokalisiert durch Aktivierung einer photographischen Emulsion. Ferner ist bekannt (B. E. Noyes und G. R. Stark, Cell 5, 301, 1975), um gleichen Zweck die denaturierte DNA bzw. RNA kovalent an Cellulose mittels einer Diazobenzylgruppe zu binden.

Sequenzen von DNA aus infektiösen Mikroorganismen können als Sonden verwendet werden zur Erfassung von eventuell vorhandener komplementärer DNA in Proben von Serum, Mark, Fäkalstoffen od. dgl. zu Diagnosezwecken. Bislang werden hierzu radioaktiv oder enzymatisch markierte Sonden, die bekannte Nucleinsäuresequenzen aufweisen, verwendet.

Aufgabe der Erfindung ist es demgegenüber, ein Verfahren zur Sequenzanalyse von Nucleinsäuren sowie einen hierfür verwendbaren Nachweisträger und ein Verfahren zur Herstellung dieses Trägers zu schaffen, bei welchen die Durchführung der Sequenzanalyse von Nucleinsäuren mit unmarkierten Sonden durchgeführt werden kann.

Diese Aufgabe wird gelöst durch die kennzeichnen-
den Merkmale der Ansprüche 1, 7 und 13, wobei in den
Unteransprüchen Weiterbildungen der Erfindung ge-
kennzeichnet sind.

Aus der DE-OS 23 30 702 ist ein Verfahren zum
Nachweis spezifischer Proteine mit Hilfe eines an einen
Träger gebundenen Antikörpers bekannt. Im Gegen-
satz dazu handelt es sich jedoch bei der Erfindung dar-
um, daß eine zu untersuchende Nucleinsäure während
der Analyse auf einem festen Träger immobilisiert wird,
an dem eine Nucleinsäure mit bekannter Sequenz che-
misch gebunden ist und das Dickenwachstum der orga-
nischen Schicht gemessen wird.

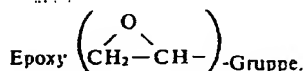
Hierzu wird denaturierte einsträngige DNA bzw.
RNA kovalent gebunden auf einer lichtreflektierenden
Oberfläche des Trägers, und dieser Träger wird als
Nachweismedium mit der zu untersuchenden Probe,
welche denaturierte Nucleinsäure, deren Sequenz zu
analysieren ist, in Berührung gebracht. Komplementäre
denaturierte Nucleinsäure in der Probe wird an der am
Träger vorhandenen, eine bestimmte Sequenz aufwei-
sende einsträngige Nucleinsäure gebunden, wodurch
durch optische Messung das Dickenwachstum der sich da-
bei bildenden organischen Schicht, durch welche insbe-
sondere die Reflexionseigenschaften der reflektieren-
den Trägeroberfläche verändert werden, nachweisbar
ist. Dieser Nachweis kann dadurch erfolgen, daß Ände-
rungen der Lichtpolarisation nach der Reflexion an der
Trägeroberfläche oder Änderungen der Interferenzfar-
ben ermittelt werden. Zur Überwachung des Polarisati-
onsverhaltens kann bevorzugt das in der europäischen
Patentschrift 19 088 bzw. in der US-PS 43 32 476 be-
schriebene ellipsometrische Verfahren sowie die dort
beschriebene ellipsometrische Vorrichtung zur Unter-
suchung der physikalischen Eigenschaften der Oberflä-
che einer Probe verwendet werden. Für den Nachweis
der Änderung der Interferenzfarben des an der Träger-
oberfläche reflektierten Lichts infolge der aufgewachse-
nen organischen Schicht eignet sich ein Trägerkörper,
auf dessen reflektierender Oberfläche eine Doppel-
schicht, nämlich eine Reflexions-Antireflexionsschicht
vorhanden ist, auf welcher der Nucleinsäurestrang mit
der bekannten Sequenz immobilisiert ist. Als derartiger
Trägerkörper eignet sich insbesondere ein solcher, wie
er in der DE-OS 32 15 484 beschrieben ist.

Ein geeigneter Trägerkörper, der bei der durchzufüh-
renden Analyse mit der zu untersuchenden Probe als
Nachweismedium in Berührung gebracht wird, besitzt
bevorzugt eine Silicium- oder Aluminiumoberfläche, auf
der ein Siliciumwasserstoff mit einer funktionellen
Gruppe als Schicht aufgebracht ist. An dieser Silicium-
wasserstoffschicht wird dann der Nucleinsäurestrang
mit der bekannten bzw. bestimmten Sequenz durch che-
mische Bindung, insbesondere kovalente Bindung, im-
mobilisiert. In vorteilhafter Weise kann noch eine Zwi-
schenschicht aus einem Polysaccharid, insbesondere
Dextran, zur Immobilisierung der Nucleinsäure aufge-
bracht werden.

Von Vorteil ist bei der Erfindung, daß die Nucleinsäu-
resonden, welche die Nucleinsäure mit bekannter Ei-
genschaft, insbesondere Sequenz, enthalten, für den
nachfolgenden Nachweis nicht mehr markiert werden
müssen. Es können bei der Erfindung somit bekannte
Proben mit unmarkierten Sonden untersucht werden.
Der hierzu erforderliche Trägerkörper läßt sich einfach
herstellen und besitzt einen einfachen Aufbau. Die
Nachweisreaktion läßt sich in einfacher Weise in einem
Vergleichsellipsometer, wie es beispielsweise im euro-

päischen Patent 19 088 bzw. in der US-PS 43 32 476 be-
schrieben ist, durchführen. In dieser Vorrichtung lassen
sich komplementäre Sequenzen, die sich an dem auf
dem Träger befindlichen Nucleinstrang gebildet haben,
visuell sichtbar machen und damit nachweisen und be-
stimmen. Der Träger wird dabei in der bekannten ellip-
sometrischen Vorrichtung als Probe eingesetzt. Man be-
nötigt daher bei der Erfindung einen relativ geringen
apparativen Aufbau im Gegensatz zu den bislang be-
kannten Verfahren.

Die reflektierende Trägeroberfläche besteht bevor-
zugt aus Siliciumdioxid oder Aluminiumoxid. Auf diese
ist eine Schicht eines Siliciumwasserstoffs aufgebracht,
der eine funktionelle Endgruppe enthält. Hierfür eignet
sich insbesondere eine Amino(NH₂-) oder eine



Die Bindung der Siliciumwasserstoffschicht an der re-
flektierenden Oberfläche erfolgt spontan an Silanol-
gruppen bzw. Aluminiumhydroxylgruppen. Die denatu-
rierte Nucleinsäure (DNA bzw. RNA) mit einer be-
stimmten bekannten Verknüpfungsfolge werden chem-
isch, insbesondere kovalent, über eine Diazobenzyl-
gruppe direkt an die Siliciumwasserstoffschicht oder
über eine Zwischenschicht aus einem Polysaccharid,
beispielsweise Dextran, gebunden.

Die Probe wird vor der Analyse denaturiert, bei-
spielsweise in 0,5 M Natriumhydroxid od. dgl. und an-
schließend neutralisiert, und nachfolgend wird noch ein
Hybridisierungspuffer zugegeben, dessen Zusammen-
setzung eine langsame Verknüpfung der komplemen-
tären Nucleinsäurestränge, insbesondere der DNA-
bzw. RNA-Stränge ermöglicht. Dieser Puffer kann bei-
spielsweise aus 50% Formamid, 0,05 M Natriumcitrat,
0,1% Dodecylsulfat, 1 mM EDTA (Ethyldiamintetra-
essigsäure) bzw. deren Na-Salz, 0,02% Albumin und 2%
Dextransulfat bestehen. Die Verknüpfung der komple-
mentären Nucleinsäure aus der Probe mit dem kovalent
am Träger immobilisierten Nucleinstrang äußert sich im
Anwachsen der Dicke der dabei auf der Trägeroberflä-
che gebildeten organischen Schicht. Nach Spülen mit
einer Kochsalzlösung und Wasser und anschließendem
Trocknen läßt sich die Dicke der aufgewachsenen orga-
nischen Schicht, wie schon erwähnt, mit Hilfe der Ver-
gleichsellipsometrie (US-PS 43 32 476 oder EP 19 088)
oder durch Messung der Änderung der Interferenzfar-
ben von aus Siliciumoxiden bestehenden Doppelschich-
ten an reflektierenden Trägerkörpern, wie sie beispiels-
weise in der DE-OS 32 15 484 beschrieben sind, ermit-
teln bzw. messen.

Im folgenden werden Ausführungsbeispiele zur Her-
stellung eines Trägers, welcher als Nachweismedium bei
der Sequenzanalyse von Nucleinsäuren verwendet wird,
im einzelnen beschrieben. Diese Träger besitzen eine
lichtreflektierende Trägeroberfläche, auf welcher die
denaturierte DNA oder RNA durch kovalente Bindung
aufgebracht ist.

Beispiel 1

Ein Siliciumplättchen oder Glasplättchen bzw.
-scheibchen, auf welches Silicium oder Aluminium bei-
spielsweise durch Aufdampfen aufgebracht ist, wird in
einem Exikator angeordnet, der mit einem Einlaßbahn
und einem Auslaßbahn versehen ist. Der Druck im In-

uern des Exsiccators wird auf etwa 10 mm Hg verringert und die Temperatur auf 80°C gehalten. Ein Kolben, der Epoxysiliciumwasserstoff enthält, wird an den Einlaß des Exsiccators angeschlossen, und der Einlaßhahn am Exsiccator wird geöffnet. Der Siliciumwasserstoff wird dabei auf der Oberfläche des mit Silicium bzw. Aluminium beschichteten Silicium- bzw. Glaskörpers durch Destillation aufgebracht, wobei innerhalb von etwa zwei Stunden eine epoxy-aktivierte Oberfläche entsteht. Die beschichteten Körper werden dann in eine Lösung von 12% 2-Aminothiophenol in Aceton eingetaucht und über einen längeren Zeitraum, etwa 10 Stunden, in einem Inkubator aufbewahrt. Anschließend werden die beschichteten Körper gewaschen und bis zu ihrer weiteren Verwendung in Wasser aufbewahrt. Die beschichteten Körper werden dann in 1 M Salzsäure, welche 250 µg/ml Natriumnitrid aufweist, eine Stunde bei 4°C eingetaucht, gewaschen und in einer Feuchtekammer aufbewahrt. Isolierte reine DNA wird in 25 mM Phosphatpuffer gelöst, auf 90°C erhitzt, ein dem vierfachen Volumen der vorhandenen Lösung entsprechendes Volumen an Dimethylsulfoxid wird zugesetzt und im Zeitraum von etwa 10 Stunden tropfenweise auf die Schichtkörperoberfläche aufgebracht und gezüchtet. Die plättchenförmigen Schichtkörper werden dann wieder gewaschen und in einer Lösung von Albumin (10 µg/ml) in einem Phosphatpuffer durch Inkubation nachbehandelt, um die Oberfläche für unspezifische Adsorption zu inaktivieren.

Beispiel 2

Die Trägerplättchen werden mit Epoxysiliciumwasserstoff oder Aminosiliciumwasserstoff wie im Beispiel 1 behandelt. Anschließend wird Dextran an die epoxy- bzw. aminoaktivierte Oberfläche durch Inkubation in einer 20%-Lösung von Dextran in Wasser gebunden. Hierdurch entsteht ein 20 bis 40 Å dicker Überzug aus Dextran auf der Oberfläche. Alternativ hierzu kann Dextran durch Inkubation mit 0,01% Natriumperjodat bei pH 8,0, welches in einer Sephadex-G25-Säule entsalzt ist, auf der mit Aminosiliciumwasserstoff beschichteten Oberfläche während etwa 10 Stunden gezüchtet werden. Das gebundene Dextran wird dann stabilisiert, durch Inkubation mit einer 0,1%igen Natriumborhydridlösung in 0,1 M Acetatpuffer bei pH 5,0. Anschließend wird 0,1 M Natriumhydroxid (10 ml) und 1,4 Butandiolglycidylether (1 ml) auf die plattenförmigen Trägerkörper im Zeitraum von etwa 10 Stunden aufgebracht, und anschließend wird ebenfalls in einem Zeitraum von etwa 10 Stunden 12% 2-Aminothiophenol in Aceton den Trägerplättchen zugegeben. Die Trägerplättchen werden dann in Wasser aufbewahrt. Isolierte und reine DNA oder RNA wird dann nach einer Nitridbehandlung der Platten wie im Beispiel 1 auf die Trägerplättchen aufgebracht.

Beispiel 3

Die Trägerplättchen werden mit einer 20 bis 40 Å dicken Schicht aus Dextran, wie im Beispiel 2 beschrieben, beschichtet. Die mit Dextran beschichteten Trägerplättchen werden dann zur Inkubation mit einer Lösung aus 0,2 g Natriumacetat in Wasser (10 ml), welches auch 1 g 1-((m-Nitrobenzyloxy)methyl)pyridiniumchlorid behandelt, anschließend in einem Ofen bei 70°C getrocknet und dann bei 140°C während etwa einer Stunde gebacken. Die Trägerplättchen werden dann zur Inku-

bation in einer 20%igen Lösung von Natriumditionid behandelt und mit Wasser gewaschen. Ferner werden dann die Trägerplättchen in 1 M Salzsäure, welche 250 µg/ml Natriumnitrid aufweist, etwa eine Stunde lang bei 4°C eingetaucht, gewaschen und in einer Befeuchungskammer aufbewahrt. Abschließend wird dann isolierte, reine DNA bzw. RNA gelöst und durch Züchtung, wie im Beispiel 1 beschrieben, auf die vorstehend behandelten Trägerplättchen aufgebracht.

Im folgenden werden anhand der beiliegenden Figuren Ausführungsbeispiele für bei der Sequenzanalyse von Nucleinsäure verwendbaren Trägern beschrieben.

Bei den in den Fig. 1 bis 3 dargestellten Ausführungsbeispielen handelt es sich um schematische Darstellungen der in Form von Plättchen ausgebildeten Träger, wobei lediglich die Reihenfolge der Anordnung der einzelnen Schichten auf dem Grundkörper veranschaulicht werden soll, ohne daß die Verhältnisse der Schichtdicken der dargestellten Schichtdicken den in der Praxis vorhandenen Maßstäben entsprechen.

In der Fig. 1 befindet sich auf einem Trägergrundkörper 1, der beispielsweise aus Silicium oder Glas bestehen kann, eine Siliciumdioxidschicht 2, welche auch eine Aluminiumoxidschicht sein kann, die als reflektierende Oberfläche wirkt. Auf dieser Schicht befindet sich eine Schicht 3 aus Siliciumwasserstoff mit funktionellen Epoxy- oder Aminogruppen. Darüber befindet sich die Schicht 4, in welcher die auf dem Träger immobilisierte bzw. fixierte einsträngige Nucleinsäure, beispielsweise DNA, vorhanden ist.

Das Ausführungsbeispiel des in der Fig. 2 dargestellten Trägers entspricht im wesentlichen dem in der Fig. 1 und unterscheidet sich demgegenüber lediglich dadurch, daß zwischen der Siliciumwasserstoffschicht 3 und der Schicht 4 mit der fixierten denaturierten einsträngigen Nucleinsäure eine Polysaccharidschicht 5, insbesondere aus Dextran, angeordnet ist.

Bei dem in der Fig. 3 dargestellten Ausführungsbeispiel ist die reflektierende Oberfläche zweischichtig ausgebildet, wobei die auf dem Grundkörper 1 aufliegende erste Schicht 2' aus Siliciummonoxid und die zweite Schicht 2 aus Siliciumdioxid besteht. Die Wirkungsweise dieser Doppelschicht ist im einzelnen in der DE-OS 32 15 484 beschrieben.

Hierzu 1 Blatt Zeichnungen